



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : G01N 27/447, 1/34 // C12Q 1/68		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/53304 (43) Date de publication internationale: 21 octobre 1999 (21.10.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/00830			(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22) Date de dépôt international: 9 avril 1999 (09.04.99)			
(30) Données relatives à la priorité: 98/04878 10 avril 1998 (10.04.98) FR			
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): BIO MERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy l'Etoile (FR).			
(72) Inventeurs; et			
(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): SANTORO, Lyse [FR/FR]; 47, avenue Bergeron, F-69260 Charbonnières les Bains (FR). BROYER, Patrick [FR/FR]; 11, avenue Roberto Rossellini, F-69100 Villeurbanne (FR). RODRIGUE, Marc [FR/FR]; 14 E, chemin de Gargantua, F-69570 Dardilly (FR). COLIN, Bruno [FR/FR]; 23, chemin des Garennes, F-69280 Marcy l'Etoile (FR). BARRAL-CADIERE, Sophie [FR/FR]; 175, route de Vienne, F-69008 Lyon (FR).			
(74) Mandataire: CABINET GERMAIN & MAUREAU; Boîte postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR).			

(54) Title: METHOD FOR ELECTROELUTION OF A BIOLOGICAL SAMPLE AND IMPLEMENTING DEVICE

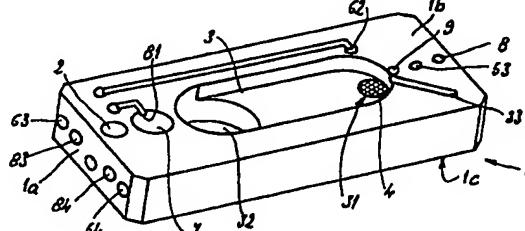
(54) Titre: PROCEDE D'ELECTRO-SEPARATION D'UN ECHANTILLON BIOLOGIQUE ET DISPOSITIF DE MISE EN OEUVRE

(57) Abstract

The invention concerns a method for treating by the action of an electric field in liquid medium a biological sample comprising both a nucleic material and a non-nucleic material, which consists in: a) providing a buffer solution; b) providing a permeable membrane, in contact on one side with the buffer solution, and having a predetermined interrupting threshold to stop the nucleic material, on said buffer solution side, when it is migrating under the action of the electric field; c) generating said electric field; d) placing the biological sample in the buffer solution, upstream of the membrane, along the nucleic material circulating direction by the electric field action. The invention is characterised in that it consists in: directly applying the electric field to the biological sample in the buffer solution, for a limited time interval determined by sufficient time for the nucleic material to arrive on the membrane and by its presence on the buffer solution side, and by the fact that at said time interval end the non-nucleic material has not migrated and/or is still in the process of migrating towards said membrane; removing the nucleic material after said time interval, and thereby electroeluting from the biological sample at least the nucleic material. The invention also concerns the implementing device.

(57) Abrégé

Procédé de traitement sous l'action d'un champ électrique en milieu liquide, d'un échantillon biologique comprenant à la fois un matériel nucléique et un matériel non nucléique: a) on dispose d'une solution tampon; b) on dispose d'une membrane perméable, en contact d'un côté avec la solution tampon, et ayant un seuil de coupure prédéterminé pour arrêter le matériel nucléique, du côté de ladite solution tampon, lors de sa migration sous l'action du champ électrique; c) on établit ledit champ électrique; d) on dispose l'échantillon biologique dans la solution tampon, en amont de la membrane, selon le sens de circulation du matériel nucléique sous l'action du champ électrique; caractérisé en ce que: on applique le champ électrique directement à l'échantillon biologique dans la solution tampon, pendant une durée limitée et définie, d'une part par le temps suffisant pour l'arrivée sur la membrane et la présence de matériel nucléique du côté de la solution tampon, et d'autre part par le fait qu'au terme de ladite durée le matériel non nucléique n'a pas migré et/ou demeure en



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	**	**	SC	**		

PROCEDE D'ELECTRO-SEPARATION D'UN ECHANTILLON BIOLOGIQUE ET DISPOSITIF DE MISE EN OEUVRE

La présente invention concerne un procédé d'électro-séparation d'une fraction nucléique à partir d'un lysat cellulaire, ainsi que tout 5 dispositif, notamment à usage unique, pour la mise en oeuvre dudit procédé d'électro-séparation.

Différents procédés, mais aussi dispositifs, ont été à ce jour proposés ou décrits, aux fins de séparer un matériel nucléique ou une fraction nucléique, à partir d'un lysat cellulaire.

10 Par " séparation ", on entend de manière générique tout processus permettant d'enrichir ou concentrer un milieu, isoler ou déterminer (de manière qualitative et/ou quantitative) dans un milieu complexe, au moins un matériel nucléique, c'est à dire de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et/ou de l'acide ribonucléique (ARN).

15 Conformément au document de la Société ISCO, dénommé ISCO Applications (Bulletin 54, " Electroelution of Nucleic Acids and Proteins from Gels, and Electrophoretic Concentration of Macromolecules 1989), mais aussi conformément au document US-C-4 164 464, il est décrit un dispositif d'électro-élution, et non d'électro-séparation, 20 comprenant:

- un premier réservoir pour une première solution tampon, comportant deux compartiment opposés, fermés chacun par une membrane perméable, l'une de section importante, et l'autre de section faible, et présentant chacune un seuil de coupure permettant de retenir le matériel 25 nucléique ou protéique d'intérêt,

- un second réservoir pour une deuxième solution tampon, identique ou différente de la première solution tampon, séparé du premier réservoir par lesdites membranes,

30 - deux électrodes en contact électrique avec la seconde solution tampon, générant un champ électrique traversant les deux membranes perméables, de celle de section importante à celle de section faible, et donc traversant la première solution tampon.

35 Ce dispositif sert à concentrer une fraction nucléique ou protéique, déjà relativement pure mais diluée, en disposant cette fraction sur la membrane de section importante, et en recueillant sur la membrane de section faible la même fraction, mais concentrée. La concentration est

obtenue du fait du transport des biomolécules par les lignes de champ électrique, qui se concentrent au niveau de la membrane de faible section.

Il ne s'agit donc ni d'un procédé, ni d'un dispositif de séparation, au sens de la définition précédente, c'est à dire au sens où à 5 partir d'un milieu complexe on sépare ou isole un matériel biologique d'intérêt.

Conformément à la figure 5 du document US-C- 5 415 758, il est décrit un procédé d'électro-élation en parallèle, au sein d'une multiplicité de puits 42 d'une plaque de titration 41. La plaque 41 est 10 immergée dans un tampon 52, sans débordement de ce dernier à l'intérieur de chaque puits 42, et chaque puits comporte une membrane 53 fermant une ouverture 54 ménagée dans son fond, en sorte que une communication osmotique puisse s'établir entre le tampon 52 et un tampon 55 disposé dans chaque puits 42. Dans chaque puits 42 s'établit un champ électrique, 15 grâce à une cathode 24, distribuée entre les différents puits 42, et l'anode unique 14. L'échantillon biologique 44, comportant un matériel nucléique, par exemple une goutte de sang disposée sur un support poreux, est élué par le flux électrolytique, en sorte que dans chaque puits le matériel nucléique se trouve dissous ou distribué, pour un prélèvement ultérieur, par 20 exemple avec une pipette.

De manière générale, le document US-C-5 415 758 décrit un procédé de traitement sous l'action d'un champ électrique en milieu liquide, d'un échantillon biologique comprenant à la fois un matériel nucléique et un matériel non nucléique, par exemple protéique, libres et mobiles dans ledit 25 milieu liquide sous l'action du champ électrique, procédé selon lequel :

- a) on dispose d'une solution tampon,
- b) on dispose d'une membrane perméable, en contact d'un côté avec la solution tampon, et ayant un seuil de coupure prédéterminé pour arrêter le matériel nucléique, du côté de ladite solution tampon, lors de sa 30 migration sous l'action du champ électrique,
- c) on établit ledit champ électrique, en sorte que ses lignes de force passent au sein de la solution tampon, et traversent la membrane perméable.
- d) on dispose l'échantillon biologique dans la solution tampon, 35 en amont de la membrane, selon le sens de circulation du matériel nucléique sous l'action du champ électrique,

En pratique, un tel procédé ne permet pas de séparer le matériel nucléique de l'échantillon biologique, jusqu'au point d'éliminer pratiquement tout matériel non nucléique, par exemple protéique.

D'autre part, aux fins de séparer un matériel nucléique, on 5 connaît la demande de brevet publiée sous le numéro WO 97/41219, qui divulgue un procédé pour capturer des acides nucléiques à partir d'un mélange constitué par exemple de cellules lysées. Le procédé nécessite de déposer une électrode dans le mélange, d'appliquer à l'électrode un voltage permettant d'attirer les acides nucléiques, puis d'enlever l'électrode 10 recouverte par les acides nucléiques. L'électrode recouverte des acides nucléiques est alors plongée dans une solution permettant, par inversion du courant, de libérer les acides nucléiques qui sont ensuite directement amplifiables. Le voltage appliqué pour pouvoir effectuer une amplification est de préférence de 0,5 à 3 volts pendant environ 30 secondes. Ce 15 procédé, bien qu'utile pour séparer des plasmides contenus dans des cellules *E.coli* lysées par chauffage, n'est pas adapté pour séparer l'ADN et/ou l'ARN d'un lysat plus complexe de cellules, notamment provenant d'un échantillon biologique.

Conformément à la figure 1 du document WO 97/34908, il est 20 décrit un procédé de séparation d'un matériel nucléique à partir d'un échantillon biologique, en deux étapes :

- une première étape consiste à mettre en contact l'échantillon biologique lysé avec un adsorbant, de manière à fixer séparément le matériel nucléique,
- 25 - une deuxième étape consiste à relarguer ce matériel nucléique, à partir de l'adsorbant.

Pour le relargage, on dispose dans un récipient 10 d'une solution tampon, soumise à un champ électrique entre deux électrodes 20a et 20b. Un récipient séparé 15, mais immergé dans la solution tampon, est 30 disposé dans le récipient 10. Ce récipient communique avec le reste du récipient 10, par l'intermédiaire d'un orifice 12, au travers duquel est disposée une membrane 30 permettant d'arrêter le matériel nucléique en mouvement sous le champ électrique. Auprès de cet orifice est situé un puits 60 de prélèvement du matériel nucléique. Et c'est dans la partie 17 35 du récipient 15, qu'est disposé l'élément adsorbant duquel on veut relarguer le matériel nucléique.

Au terme de cet inventaire, aucun procédé n'apparaît permettre de séparer de manière simple et efficace, un matériel nucléique d'un matériel non nucléique, notamment protéique, à partir d'un lysat cellulaire complexe.

5 La présente invention se propose d'apporter une solution à ce problème non résolu.

Conformément à la présente invention, on a découvert qu'on pouvait électro-séparer au moins le matériel nucléique d'un échantillon biologique, de manière efficace, en traitant l'échantillon biologique 10 directement sous l'action d'un champ électrique en milieu liquide, et en choisissant les conditions opératoires suivantes :

- on applique le champ électrique directement à l'échantillon biologique dans la solution tampon, pendant une durée limitée et définie, d'une part par le temps suffisant pour l'arrivée sur la membrane arrêtant le 15 matériel nucléique, et la présence de matériel nucléique du côté de la solution tampon, et d'autre part par le fait qu'au terme de ladite durée le matériel non nucléique n'a pas migré et/ou demeure en cours de migration vers ladite membrane,

- on prélève le matériel nucléique au terme de ladite durée.

20 Par "électro-séparation" dans la présente invention, on entend que des molécules présentes ensemble dans un milieu, et pouvant présenter des charges électriques identiques, sont distinguées les unes des autres dans ledit milieu en raison de leurs cinétiques respectivement différentes dans un même champ électrique.

25 Le procédé selon l'invention apporte l'avantage essentiel d'obtenir rapidement et facilement une fraction nucléique exempte d'autres constituants, notamment protéines, directement amplifiable, à partir d'un lysat cellulaire. On connaît les difficultés liées aux techniques d'amplification, notamment pour les échantillons de type respiratoire, en ce 30 que la fraction à amplifier doit être exempte d'inhibiteurs. Par la mise en oeuvre du procédé selon l'invention, les inhibiteurs protéiques des techniques d'amplification sont pratiquement éliminés.

La fraction enrichie en matériel nucléique, comprenant l'ADN et/ou l'ARN, que l'on obtient par la mise en oeuvre du procédé selon 35 l'invention, est directement amplifiable par les techniques couramment

utilisées, telles que notamment la technique PCR pour les ADN et la technique NASBA ou TMA pour les ARN.

Dans un autre mode de réalisation selon l'invention, l'échantillon biologique est disposé sur une autre membrane, du côté de cette dernière 5 en contact avec la solution tampon.

Dans un mode de réalisation préféré selon l'invention, le temps d'application du champ électrique est au plus de 30 minutes, et préférentiellement compris entre 5 et 30 minutes.

Dans un mode de réalisation très préféré selon l'invention, la 10 durée de migration de la fraction nucléique est de 10 à 20 minutes, de préférence encore de 15 minutes.

Dans un mode de réalisation préféré selon l'invention, la valeur de la molarité de la solution tampon est au moins égale à 0,1 mol/l, et préférentiellement comprise entre 0,1 et 5 mol/l.

15 La molarité de la solution tampon étant comprise entre 0,1 et 5 mol/l, on peut effectivement, soit ne mettre qu'une même solution tampon dans les deux compartiments, soit mettre deux solutions tampon différentes dans les deux compartiments.

La molarité de la solution tampon peut être la même dans les 20 deux compartiments et sera comprise entre 0,1 et 1 mol/l, de préférence encore de 0,1 mol/l.

La molarité de la solution tampon peut être différente dans les deux compartiments et sera respectivement de préférence de 0,1 mol/l dans le premier compartiment et de 1 mol/l dans le second compartiment.

25 Dans un mode de réalisation préféré selon l'invention, le champ électrique a une valeur comprise entre 100 et 250 V, et préférentiellement égale à 150 V.

Dans un autre mode de réalisation très préféré selon l'invention, la 30 distance séparant l'échantillon biologique de la membrane perméable, en suivant les lignes de force du champ électrique, est au moins égale à 30 mm, et préférentiellement à 75 mm.

Le lysat cellulaire à partir duquel on effectue le procédé selon l'invention peut être un lysat cellulaire provenant d'une culture simple ou complexe, c'est à dire comprenant différentes cellules, ou peut être 35 également un échantillon biologique, tel que notamment du sang, de l'urine et un crachat de type respiratoire.

Le lysat cellulaire à partir duquel on obtient la fraction nucléique, soumis ensuite au procédé selon l'invention, peut être obtenu par différentes techniques de lyse, notamment la lyse par choc mécanique, par choc électrique et autres.

5 Dans un mode de réalisation préféré selon l'invention, l'échantillon biologique résulte directement de la lyse d'un échantillon cellulaire, notamment par voie mécanique ou électrique. Ce mode de réalisation est effectué dans le même dispositif, comme cela est décrit ci-après.

10 Dans un autre mode de réalisation préféré selon l'invention, le lysat cellulaire est obtenu à partir d'un prélèvement d'un liquide corporel, par exemple sang ou crachat respiratoire.

Lorsque l'échantillon biologique est du sang, on préfère que le pH de la solution tampon soit de 7.

15 La membrane récupérant la fraction enrichie en matériel nucléique présente un seuil de coupure prédéterminée, de préférence inférieure à 100 kDa.

Lorsque l'échantillon biologique est du sang, la porosité de la membrane à la cathode sera de préférence supérieure à 10 kDa.

20 Dans un mode de réalisation préféré selon l'invention, on ajoute une protéinase à l'échantillon biologique.

Dans encore un autre mode de réalisation préféré selon l'invention, la fraction enrichie en matériel nucléique est directement soumise à une étape subséquente d'amplification.

25 La lyse cellulaire sera de préférence encore effectuée par lyse électrique en présence de protéinase K et d'un détergent.

Un second objet selon l'invention est un dispositif à usage unique pour la mise en oeuvre d'un procédé selon l'invention, comprenant un support ou base, dans lequel sont rassemblés et intégrés, ainsi 30 qu'agencés entre eux, les différents moyens, notamment électrodes, requis pour l'électroséparation, ainsi que des moyens d'interfaçage dudit support avec l'extérieur, d'une part pour le transfert des différents fluides ou liquides vers et/ou hors du support, dont l'échantillon biologique, la solution tampon, et la fraction enrichie en matériel nucléique, et d'autre part pour 35 l'alimentation et la commande des moyens électriques requis au moins pour l'électroséparation, dont celle du champ électrique.

Dans un mode de réalisation préféré selon l'invention, le dispositif comprend un moyen de réception de l'échantillon biologique; un réservoir pour la solution tampon, comportant un compartiment fermé par la membrane perméable, communiquant à une extrémité opposée audit 5 compartiment avec le moyen de réception de l'échantillon biologique, ledit réservoir étant destiné à recevoir une première solution tampon; et un second réservoir pour une seconde solution tampon, identique ou différente de la première solution tampon, séparé du premier réservoir uniquement par ladite membrane; deux électrodes de génération du champ électrique, l'une 10 au contact de la première solution tampon, en amont de la membrane selon le sens de circulation du matériel nucléique, et l'autre au contact de la seconde solution tampon; et un moyen d'extraction de la fraction enrichie en matériel nucléique du compartiment fermé par la membrane.

Dans un mode de réalisation très préféré selon l'invention, le 15 réservoir comprend un autre compartiment, pour la réception d'au moins une fraction obtenue à partir de l'échantillon biologique, disposé en amont dudit compartiment selon le sens de circulation du matériel nucléique, communiquant avec le moyen de réception de l'échantillon biologique.

Dans un autre mode de réalisation préféré selon l'invention, les 20 deux réservoirs communiquent respectivement avec des événements d'aération, et avec au moins un canal de remplissage.

Dans encore un autre mode de réalisation préféré selon l'invention, un puits intermédiaire est disposé et communique entre le moyen de réception de l'échantillon biologique et le premier réservoir.

25 Dans encore un autre mode de réalisation préféré selon l'invention, le puits intermédiaire est pourvu de moyens permettant de lyser un échantillon cellulaire.

Dans encore un autre mode de réalisation préféré selon l'invention, le puits intermédiaire est pourvu d'électrodes assurant une lyse 30 dudit échantillon cellulaire.

Dans encore un autre mode de réalisation préféré selon l'invention, le dispositif comprend, communiquant les uns avec les autres, un compartiment de réception du lysat, un puits intermédiaire de lyse, et un compartiment de réception de la fraction enrichie en matériel nucléique.

35 Dans encore un autre mode de réalisation préféré selon l'invention, le volume du compartiment de réception du lysat est supérieur

au volume du compartiment de réception de la fraction enrichie en matériel nucléique.

Dans encore un autre mode de réalisation préféré selon l'invention, la proportion entre les volumes des compartiments de réception 5 du lysat et de réception de la fraction nucléique est comprise entre $\frac{1}{2}$ et 1/50, notamment entre 1/5 et 1/20.

Un troisième objet selon l'invention est l'utilisation du dispositif décrit ci-dessus pour électro-séparer une fraction d'acides nucléiques à partir d'un lysat cellulaire.

10 Un quatrième objet selon l'invention est l'utilisation de la fraction électro-séparée par la mise en oeuvre du procédé selon l'invention pour détecter et/ou identifier des acides nucléiques directement après amplification.

La Figure 1 représente schématiquement un appareil 15 d'électroélution d'acides nucléiques et de protéines à partir d'un gel, et de concentration électrophorétique de macromolécules (Isco, Nebraska, USA), que l'on utilise dans un procédé différent, à savoir d'électro-séparation selon l'invention. Les compartiments A et B, dans lequel sont plongés deux électrodes négative et positive respectivement, sont remplis de tampon 20 TBE 1x; le compartiment C, comprenant une partie C1 et une partie C2, et le compartiment Cf sont remplis de tampon TBE 0.1x. Une membrane de dialyse est placée à l'interface des compartiments Cf et B (porosité 100 kDa), et des compartiments C1 et A (porosité 10 kDa).

La Figure 2 indique le pourcentage d'acides nucléiques de *S. 25 epidermidis* récupérés dans le compartiment Cf, après migration à partir d'un lysat cellulaire obtenu par chocs mécaniques, déterminé par analyse avec un appareil Vidas (BioMerieux, France), selon l'exemple 2. En abscisse est représenté le temps de migration (minutes), et en ordonnée est représenté le pourcentage d'acides nucléiques récupérés dans le 30 compartiment Cf, exprimé en unités relatives de fluorescence.

La Figure 3 présente la cinétique de récupération des protéines d'un lysat cellulaire. Le pourcentage des protéines du lysat bactérien est récupéré dans le compartiment Cf, après migration à partir d'un lysat cellulaire obtenu par chocs mécaniques, déterminé par dosage Bradford, 35 selon l'exemple 2. En abscisse est représenté le temps de migration (minutes), et en ordonnée est représenté le pourcentage d'acides

nucléiques récupérés dans le compartiment Cf, exprimé en densité optique (DO) à 595 nm.

La Figure 4 présente la cinétique de récupération d'acides nucléiques à partir de lysat cellulaire. Le pourcentage d'acides nucléiques de *Staphylococcus epidermidis*, récupéré dans le compartiment Cf après migration à partir d'un lysat cellulaire obtenu par chocs électriques, est déterminé par analyse avec un appareil Vidas, selon l'exemple 2. En abscisse est représenté le temps de migration (minutes), et en ordonnée est représenté le pourcentage d'acides nucléiques récupérés dans le compartiment Cf, exprimé en unités relatives de fluorescence.

La Figure 5 présente l'amplification des acides nucléiques purifiés à partir d'un lysat cellulaire. La quantité d'amplicons produits par PCR à partir de 10 µl de molécules d'ADN est récupérée dans le compartiment Cf, à partir d'un lysat cellulaire obtenu par chocs mécaniques, après différents temps de migration, selon l'exemple 2. En abscisse est représenté le temps de migration (minutes), et en ordonnée est représenté le pourcentage d'acides nucléiques récupérés dans le compartiment Cf, exprimé en unités relatives de fluorescence.

La Figure 6 présente la quantité d'amplicons produits par amplification PCR, après lyse de différentes concentrations initiales de bactéries par chocs mécaniques, et migration de leur matériel nucléique pendant 15 minutes sous un champ électrique, selon l'exemple 2. En abscisse est représenté le nombre de bactéries initiales pour 200 µl de lysat, et en ordonnée est représenté le signal obtenu après PCR, exprimé en unités relatives de fluorescence.

La Figure 7 illustre la quantité d'amplicons produits par amplification TMA, après lyse de différentes concentrations initiales de bactéries par chocs mécaniques, et migration de leur matériel nucléique pendant 15 minutes sous champ électrique, selon l'exemple 2. En abscisse est représenté le nombre de bactéries initiales pour 200 µl de lysat, et en ordonnée est représenté le signal obtenu après TMA, exprimé en DO x 1000.

La Figure 8 indique le pourcentage de protéines du sang récupéré dans le compartiment Cf en fonction du temps de migration d'un échantillon clinique sanguin lysé par chocs mécaniques, selon l'exemple 3. En abscisse est représenté le temps de migration (minutes), et en ordonnée

est représenté le pourcentage de protéines récupéré dans le compartiment Cf, exprimé en DO à 595 nm.

La Figure 9 indique le pourcentage de protéines d'un crachat récupéré dans le compartiment Cf en fonction du temps de migration d'un échantillon clinique de type respiratoire lysé par chocs mécaniques, selon l'exemple 2. En abscisse est représenté le temps de migration (minutes), et en ordonnée est représenté le pourcentage de protéines récupéré dans le compartiment Cf, exprimé en DO à 595 nm.

La Figure 10 montre l'élimination des inhibiteurs de la PCR initialement présent dans l'échantillon clinique de type respiratoire. Elle indique la quantité d'amplicons ADN produits par PCR à partir de différentes quantités initiales d'ADN de *S. epidermidis*, selon l'exemple 5. En abscisse est représenté le nombre de copies d'ADN initiales pour 10 μ l d'échantillon, et en ordonnées est représenté le signal obtenu après PCR, exprimé en unités relatives de fluorescence.

La Figure 11 indique la quantité d'amplicons produits à partir de différentes quantités initiales de bactéries lysées et déposées dans le compartiment C1. Chaque point représenté sur le graphe représente une valeur moyenne obtenue à partir de 13 crachats et aspirations bronchiques différents, selon l'exemple 5. En abscisse est représenté le nombre de copies d'ADN initiales pour 200 μ l d'échantillon, et en ordonnées est représenté le signal obtenu après PCR, exprimé en unités relatives de fluorescence.

La Figure 12 indique la quantité d'amplicons produits à partir de différentes quantités initiales de bactéries lysées par chocs mécaniques, et déposées dans le compartiment C1, selon l'exemple 5. L'étude a été réalisée en parallèle sur 4 crachats différents. En abscisse est représenté le nombre de copies d'ADN initiales pour 200 μ l d'échantillon, et en ordonnées est représenté le signal obtenu après TMA, exprimé en DO x 1000.

La figure 13 représente un dispositif à usage unique selon l'invention, vu en perspective.

La figure 14 représente une vue de dessous du dispositif représenté à la figure 13.

La figure 15 représente une vue de dessus du dispositif représenté à la figure 13.

La figure 16 représente une vue en coupe, selon le trait de coupe représenté à la figure 15, du dispositif selon la figure 13.

Exemple 1 : Mode opératoire général pour mettre en oeuvre le procédé selon l'invention.

Le mode opératoire est basé sur l'utilisation d'un appareil d'électroélution d'acides nucléiques selon la figure 1. Un volume d'échantillon biologique est déposé soigneusement au fond du compartiment C1. Les deux électrodes du circuit sont reliées à un générateur électrique. Une tension constante de 150 V est appliquée aux bornes du générateur. L'intensité du circuit varie de 15 à 20 mA et la température du tampon dans le compartiment C varie de 23 à 30°C. Les molécules biologiques initialement déposées au fond du compartiment C1 migrent dans le champ électrique ainsi créé, à vitesse définie en fonction de leur charge et de leur taille. Après différents temps de migration, la tension aux bornes du générateur est arrêtée et les molécules ayant migré vers la cathode et de poids moléculaire apparent inférieur ou égal à 10 kDa sont recueillies dans le compartiment Cf, dans un volume final de 200 µl. L'échantillon ainsi récupéré est conservé dans la glace avant analyse.

L'échantillon biologique déposé dans le compartiment C1 peut être un matériel nucléique et/ou protéique purifié ou non, un lysat cellulaire, provenant d'un échantillon biologique tel que le sang, l'urine et un crachat de type respiratoire. Les lysats cellulaires étudiés ont été obtenus à partir de *S. epidermidis*, bactérie à paroi Gram+ (A054). Ces bactéries sont cultivées en milieu liquide BCC (Bouillon Coeur Cervelle, bioMerieux 41019). Avant lyse, elles sont mises en suspension, soit dans un prélèvement clinique (crachat liquéfié et décontaminé, sang, plasma, sérum,), soit en tampon de lyse (30 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl pH 7.2). 300 µl de cette suspension cellulaire ont été lysés en suivant essentiellement deux protocoles :

- Protocole de lyse par chocs mécaniques : 90 µl de billes de verre de diamètre compris entre 90 et 150 µm, 3 billes de fer de diamètre 2 mm et 5 billes de verre de diamètre 3 mm sont placés dans un tube Falcon en présence de 300 µl de la suspension cellulaire, comme décrit dans le brevet (FR-A-2 768 743). 6 mg /ml final de protéinase K (PK) (E.C. 3.4.21.14 Boehringer-Mannheim, ref. 1092766) peut être ajoutée à la suspension cellulaire. Le tube fermé est vortexé pendant deux minutes, à

puissance maximale de l'appareil (Reax 2000, Heidolph). La suspension bactérienne ainsi traitée et récupérée est déposée immédiatement dans le compartiment C1 du dispositif décrit dans la Figure 1. Si la PK est présente dans la solution cellulaire, une incubation supplémentaire de 15 minutes à 5 37°C est réalisée.

- Protocole de lyse par choc électrique : 300 μ l de la suspension cellulaire sont déposés dans une cuve d'électroporation caractérisée par une distance entre les deux électrodes de 2 mm, en présence de 0.01 à 6 mg /ml final de PK. La cuve est placée dans un circuit 10 électrique dont les paramètres sont choisis comme suit : tension 500 V, résistance 186 Ohms, capacité de 500 ou 1500 μ FD. Après lancement d'une impulsion électrique, la décharge électrique se réalise en quelques millisecondes entre les deux électrodes. Le lysat ainsi récupéré est déposé immédiatement dans le compartiment A du dispositif décrit dans la Figure 1 15 (FR-A-2 763 957).

Le pourcentage d'acides nucléiques recueilli du côté de la cathode, après migration dans le compartiment Cf, est déterminé par mesure de DO (densité optique) de l'échantillon récupéré à 260 nm. Le pourcentage recueilli est égal au rapport de la valeur de DO à 260 nm après 20 migration, sur la valeur de DO à 260 nm avant migration. De même, la quantité de protéines recueillies à la cathode après migration est déterminée par dosage Bradford et lecture de DO à 595 nm. Le pourcentage de protéines recueillies est égal au rapport de la quantité protéique récupérée sur la quantité initiale.

25 La quantité des acides nucléiques récupérés du côté de la cathode après migration est vérifiée sur gel d'agarose 0.8% ; 10 μ l de l'échantillon sont déposés par puits, la migration électrophorétique est réalisée sous voltage constant (150 V) et le gel est coloré au bromure d'ethidium (BET) avant observation sous rayonnement ultra-violet. En 30 parallèle, les protéines récupérées à la cathode après migration peuvent être observées sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE 10%); 5 à 10 μ l de l'échantillon sont déposés par puits, la migration électrophorétique est réalisée sous intensité constante (25 mA), et le gel est coloré au bleu de Coomassie.

35 La quantité d'acides nucléiques récupérés du côté de la cathode est déterminée par détection spécifique selon une technique d'hybridation

dite sandwich, en utilisant l'appareil Vidas commercialisé par bioMérieux (France). Des sondes oligonucléotidiques de capture et de détection spécifiques des acides nucléiques de *S. epidermidis* (EP-A-0 632 269) ont été choisies. Les oligonucléotides de capture et de détection ont 5 respectivement pour séquence : 5'-GACCACCTGTCACTCTGTCCC-3' (SEQ ID N° :1) et 5'-GGAAGGGGAAAACTCTATCTC-3' (SEQ ID N° :2). La sonde de détection est marquée par couplage avec la phosphatase alcaline (AKP). L'hybridation spécifique de ces sondes avec les acides nucléiques libérés dans le lysat est fonction de la quantité d'acides nucléiques 10 présents, mais aussi de leur accessibilité pour les sondes utilisées.

Deux protocoles d'amplification spécifique des molécules d'ADN et d'ARN de *S. epidermidis* ont été réalisés à partir des échantillons recueillis après migration : un protocole PCR pour l'amplification de l'ADN et un protocole NASBA pour l'amplification de l'ARNr16S et un protocole 15 TMA pour l'amplification de l'ARNr 16S.

-Protocole PCR : la technique de PCR suivie est celle décrite par Goodman dans *PCR Strategies*, Ed : Innis, Gelford et Sninsky Academic press 1995, pp 17-31. Deux amores d'amplification ont été utilisées, elles présentent les séquences suivantes :

20 Amorce 1 : 5'-ATCTTGACATCCTCTGACC-3' (SEQ ID N° :3)

Amorce 2 : 5'-TCGACGGCTAGCTCCAAAT-3' (SEQ ID N° :4)

Les cycles de température suivants ont été utilisés :

1 fois 3 minutes à 94°C

2 minutes à 65°C

25 35 fois 1 minute à 72°C

1 minute à 94°C

2 minutes à 65°C

1 fois 5 minutes à 72°C

-Protocole TMA : la technique de TMA suivie est celle décrite 30 par US-A-5 554 516. Deux amores d'amplification ont été utilisées, elles présentent les séquences suivantes :

Amorce 1 : 5'-TCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA -3'(SEQ ID N° :5)

Amorce 2 : 5'-AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGGTT
35 TGTCACCGGCAGTCAACTTAGA -3'(SEQ ID N° :6)

10 μ l ou 50 μ l d'échantillon recueilli sont utilisés pour chaque essai PCR et TMA, respectivement. Les amplicons produits par PCR sont observés sur gel d'agarose 0.8% et quantifiés sur Vidas selon le protocole décrit ci-dessus. Les amplicons produits par TMA sont détectés et 5 quantifiés sur microplaqué par hybridation avec une sonde de capture et une sonde de détection, spécifiques de *S. epidermidis*, selon la méthode décrite par P. Cros *et al.*, Lancet 1992, 240 :870. La sonde de détection est couplée à la "Horse Radish Peroxidase" (HRP). Les deux sondes présentent les séquences suivantes :

10 Sonde de capture : 5'-GATAGAGTTTCCCCTTC-3' (SEQ ID N° :7)

Sonde de détection : 5'-GACATCCTCTGACCCCTCTA -3' (SEQ ID N° :8)

15 Exemple 2 : Cinétique de récupération d'acides nucléiques à partir de lysat cellulaire.

Une suspension de *Staphylococcus epidermidis* (1-5.10⁹ b./300 μ l) est lysée par choc mécanique ou par choc électrique, comme décrit dans le protocole général ci-dessus. 200 μ l de chaque lysat sont déposés au fond du compartiment C1. Le champ électrique est appliqué 20 pendant différents temps entre les deux électrodes. Les quantités d'acides nucléiques ou de protéines présentes dans l'échantillon recueilli dans le compartiment Cf sont déterminées par analyse avec un appareil Vidas ou dosage Bradford, respectivement. La qualité des molécules récupérées a été appréciée sur gel d'agarose ou d'acrylamide, en présence de SDS.

25 - Lysat cellulaire obtenu par choc mécanique :

Les acides nucléiques du lysat ont migré dans le compartiment Cf progressivement au cours du temps, comme montré à la figure 2. Après 60 minutes, la totalité du matériel nucléique du lysat est récupéré, quelque soit la présence ou non de protéinase K pendant l'étape de lyse. Ce résultat 30 est en faveur d'une bonne libération et accessibilité des acides nucléiques dans le lysat. Les molécules d'ADN récupérées ont le même profil de migration sur gel d'agarose 0.8% qu'avant migration dans le lysat. En présence de protéinase K pendant l'étape de lyse, comme montré à la figure 3, seul un pourcentage négligeable de protéines est récupéré après 35 60 minutes, tandis qu'en l'absence de protéase, environ 50% de protéines sont récupérées.

- Lysat cellulaire obtenu par choc électrique.

En présence de PK pendant l'étape de lyse, comme montré à la figure 4, les acides nucléiques du lysat migrent progressivement jusqu'à la cathode. Après 60 minutes, un pourcentage important d'acides nucléiques 5 est récupéré. La récupération du matériel nucléique présent initialement dans ce lysat est similaire à celle du matériel nucléique présent initialement dans un lysat obtenu par choc mécanique (cf. ci-dessus). Par contre, en absence de PK pendant l'étape de lyse, aucun acide nucléique ne peut être détecté dans le compartiment Cf, même après 60 minutes de migration 10 (analyse Vidas et gel d'agarose 0.8%). Sur gel d'agarose, les molécules d'ADN et d'ARN du lysat récupérées sont observables séparément après migration, alors qu'elles ne le sont pas initialement dans le lysat.

- Amplification des acides nucléiques purifiés à partir de lysat cellulaire

15 Les bactéries *S. epidermidis* diluées dans 300 µl de tampon de lyse sont lysées par choc mécanique en l'absence de PK, comme décrit dans le protocole général de l'exemple 1. 200µl du lysat sont déposés au fond du compartiment C1. Un champ électrique est appliqué entre les deux électrodes pendant différents temps. Le matériel nucléique qui a migré dans 20 le compartiment Cf est amplifié par PCR (10 µl par essai) ou TMA (50 µl par essai). La quantité d'amplicons produite est analysée par hybridation spécifique sur Vidas ou microplaques, respectivement.

- Amplification PCR des molécules d'ADN récupérées après migration :

25 Pour 10^4 bactéries initiales lysées, déposées dans le compartiment C1, différentes quantités d'amplicons sont produites, en fonction du temps de migration. Pour 15 minutes de migration, comme représenté à la figure 5, les molécules d'ADN récupérées permettent une production optimale d'amplicons par PCR. Avant 15 minutes, une quantité 30 inférieure de molécules d'ADN sont récupérées. Pour 20 minutes et après, une quantité supérieure de molécules d'ADN sont récupérées, mais de qualité moins adaptée à une amplification PCR optimale. Plus la migration dure, plus la structure de l'acide nucléique peut être altérée. Afin d'obtenir 35 une amplification PCR optimale, un compromis entre quantité et qualité des molécules d'ADN récupérées à la cathode doit être respecté. Ce résultat a

été confirmé en utilisant des suspensions initiales de *S. epidermidis* plus concentrées (10^5 - 10^6 bactéries initiales / $200\mu\text{l}$).

Comme représenté à la figure 6, l'ADN d'un nombre supérieur ou égal à 1.10^3 bactéries initiales (/ $200\mu\text{l}$) peut être amplifié et détecté, 5 après lyse mécanique des cellules et migration des constituants du lysat sous champ électrique; soit 10^2 molécules d'ADN ou bactéries par essai PCR, étant donné que le matériel migré est récupéré dans $200\mu\text{l}$ et que $10\mu\text{l}$ de ce matériel est utilisé pour chaque essai PCR. 10^2 molécules d'ADN 10 correspondent à la limite de sensibilité du protocole PCR, de façon générale. Ce résultat démontre une grande sensibilité de récupération des molécules d'ADN bactérien après lyse cellulaire par choc mécanique et 15 purification des molécules d'ADN intracellulaire par champ électrique en solution.

15 Amplification TMA des molécules d'ARN récupérées après migration :

Comme représenté à la figure 7, l'ARN de au moins 40 bactéries initiales (/ $200\mu\text{l}$) peut être détecté après lyse des bactéries, migration des constituants cellulaires sous champ électrique et amplification spécifique des ARNr16S de *S. epidermidis*; soit 10 bactéries initiales par 20 essai TMA, compte tenu que le matériel nucléique migré est récupéré dans $200\mu\text{l}$ final, et que $50\mu\text{l}$ sont ajoutés par essai TMA. Ce résultat témoigne 25 d'une grande sensibilité de récupération des molécules d'ARNr 16S bactérien, après lyse par choc mécanique et purification des acides nucléiques du lysat par champ électrique.

25 Exemple 3 : Cinétique de récupération d'acides nucléiques à partir d'un échantillon sanguin.

L'échantillon sanguin est utilisé sans pré-traitement préalable. 30 $200\mu\text{l}$ de cet échantillon clinique est déposé au fond du compartiment C1. Un voltage de 150 V est appliqué entre les deux électrodes pendant 35 différents temps, puis le matériel récupéré du côté de la cathode dans le compartiment Cf est analysé par dosage de protéines selon la méthode de Bradford, et sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE 10%).

Dans cet exemple, le pH du tampon TBE utilisé pour la migration 35 a été fixé à pH 7.0, le point isoélectrique de l'hémoglobine étant égal à 7.0. Des membranes de 50 ou 100 kDa ont été placées à l'interface des

compartiments Cf et B. Comme cela est représenté à la figure 8, après 60 minutes de migration, un pourcentage négligeable de protéines est récupéré avec la membrane de 100 kDa, et 10% des protéines sont récupérées avec la membrane de 50 kDa. A pH 7.0, seulement 10% des protéines 5 sanguines chargées négativement à pH 7.0 ont un poids moléculaire apparent supérieur à 50 kDa et inférieur à 100 kDa. Un pourcentage négligeable de protéines sont récupérées après 15 minutes de migration, en utilisant indifféremment une membrane de 50 ou 100 kDa. Ces conclusions ont été vérifiées sur gel de polyacrylamide en présence de SDS-PAGE 10%. 10 La porosité de la membrane sera préférentiellement supérieure à 10 kDa, afin de ne pas obtenir un pourcentage trop élevé de protéines.

Exemple 4 : Cinétique de récupération d'acides nucléiques à partir d'un échantillon de type respiratoire.

Avant utilisation, l'échantillon respiratoire est fluidifié, 15 décontaminé selon le protocole standard au N-acetyl-L-cysteine et à la soude (NALC/NaOH); puis il est inactivé 20 minutes à 95°C.

Dans cet exemple, le tampon TBE utilisé pour la migration a un pH égal à 8.3 ou 7.0, et des membranes de différentes tailles de pores ont été placées à l'interface des compartiments Cf et B: 10, 50 ou 100 kDa. 20 Comme cela est représenté à la figure 9, à pH 8.3, 10% des protéines sont récupérées après 30 minutes, et 70-80% après 60 minutes avec des membranes de 50 ou 10 kDa, ce qui suggère que 70-80% des protéines du crachat sont chargées négativement à ces pH et ont un poids moléculaire apparent supérieur à 50 kDa. A pH 7.0, environ 0% des protéines sont 25 récupérées après 30 ou 60 minutes de migration, quelque soit la taille des pores de la membrane utilisée (dans la limite de sensibilité des techniques de détection utilisées). A ce pH, les 55-60% des protéines préalablement récupérées à pH 8.0 ne sont plus chargées négativement. Avec les membranes de 10 ou 50 kDa, un pourcentage négligeable des protéines du 30 crachat est récupéré après 15 minutes de migration. On a vérifié ce point sur gel de polycrylamide en présence de SDS-PAGE 10%.

Exemple 5 : Levée d'inhibition de protocoles d'amplification par les échantillons de type respiratoire après migration.

Les échantillons de type respiratoire sont inhibiteurs des 35 réactions PCR et TMA. 200 µl de ces échantillons ont été déposés au fond du compartiment C1 du système décrit Figure 1. Un voltage de 150 V

constant a été appliqué entre les deux électrodes pendant 15 minutes. Une membrane de séparation entre Cf et B de 10 kDa a été choisie. Après migration, l'échantillon récupéré dans le compartiment Cf (200 μ l) a été supplémenté avec différentes quantités d'acides nucléiques purifiés de *S. epidermidis*. 5 10 μ l ou 50 μ l de cette solution ont été utilisés pour chaque essai PCR ou TMA, respectivement. Comme représenté à la figure 10, jusqu'à 10^2 - 10^3 copies initiales d'ADN peuvent être amplifiées dans 10 μ l d'échantillon migré. Ce résultat démontre que le crachat migré a perdu son caractère inhibiteur de la PCR. Des résultats similaires ont été obtenus avec 10 l'amplification TMA.

1-5. 10^9 *S. epidermidis* ont été ensemencés dans 300 μ l de crachat fluidifié, décontaminés et inactivés comme décrit dans l'exemple 4 ci-dessus. Ces cellules en suspension ont été lysées par choc mécanique en absence de PK, et le lysat a migré pendant 15 minutes sous 150 V avec 15 une membrane de 10 kDa entre les compartiments Cf et B, selon le schéma présenté à la Figure 1. La quantité d'acides nucléiques bactériens récupérés dans le compartiment Cf après migration a été quantifiée par analyse Vidas spécifique de l'espèce bactérienne étudiée. L'expérience a été réalisée à partir de différents crachats. En moyenne, 80% d'acides nucléiques *S. epidermidis* sont récupérés. 20 Ce résultat indique que les molécules de la matrice du crachat ne gênent pas la migration des molécules d'ADN et d'ARN du lysat bactérien dans le champ électrique, dans ces conditions. Au contraire, il semble que l'environnement soit propice à une meilleure récupération et/ou migration de ces molécules.

25 **Amplification PCR:**

Les bactéries *S. epidermidis* ont été ensemencées dans 300 μ l de crachat fluidifié, décontaminé, inactivé, puis lysées par choc mécanique en absence de PK comme décrit dans l'exemple 1. 200 μ l du lysat a migré pendant 15 minutes sous 150V avec une membrane de 10 kDa entre les 30 compartiments Cf et B. Le matériel nucléique présent dans l'échantillon a été amplifié par PCR (10 μ l par essai), et les amplicons produits ont été quantifiés par analyse Vidas: Comme représenté à la figure 11, jusqu'à 10^4 - 10^3 bactéries initiales lysées (/200 μ l de lysat) peuvent être détectées après migration et amplification des molécules d'ADN (soit 100-10 35 molécules d'ADN /10 μ l d'essai PCR). Ce résultat, d'une part confirme un très bon rendement de récupération des molécules d'ADN bactérien du

lysat dans le crachat, et d'autre part démontre une très bonne élimination des inhibiteurs de la PCR initialement présents dans les crachats.

Amplification TMA:

De même que pour l'étude de l'amplification PCR décrite ci-avant, les bactéries *S. epidermidis* ont été ensemencés dans 300 μ l de crachat fluidifié, décontaminé, inactivé puis lysées par choc mécanique en absence de PK. 200 μ l du lysat a migré pendant 15 minutes sous 150V avec une membrane de 10 kDa entre les compartiments Cf et A. Les molécules d'ARNr présentes dans l'échantillon récupéré ont été amplifiées par TMA (50 μ l par essai), et les amplicons produits ont été quantifiés par hybridation spécifique sandwich sur microplaqué. Comme représenté à la figure 12, au moins 10^6 - 10^5 bactéries initiales lysées (/200 μ l de lysat) peuvent être détectées après migration et amplification des molécules d'ARN (soit au moins 5.10^4 - 5.10^3 bactéries initiales /50 μ l d'essai TMA).
Ce résultat démontre l'élimination des inhibiteurs de la TMA initialement présents dans les crachats.

Exemple 6: Electro-séparation après lyse par chocs électriques.

1- 5.10^9 *S. epidermidis* ont été ensemencés dans 300 μ l de crachat fluidifié, décontaminé et inactivé comme décrit dans l'exemple 4. Ces cellules en suspension ont été lysées par choc électrique en présence de 10^{-2} mg/ml final de PK et 2% final de LLS (Lithium Lauryl Sulfate, Sigma). 200 μ l de lysat a migré pendant 15 minutes sous 150 V avec une membrane de 10 kDa entre les compartiments Cf et B, selon le schéma présenté à la figure 1. Le matériel nucléique récupéré après migration (200 μ l) a été amplifié par PCR spécifique de *S. epidermidis* (10 μ l/essai), et les amplicons produits ont été quantifiés par analyse Vidas. Jusqu'à 10^4 - 10^5 bactéries initiales lysées (/ml) peuvent être détectées après migration et amplification des molécules d'ADN (soit 100-10 molécules d'ADN/10 μ l d'essai PCR, ce qui représente la limite de sensibilité de la technique PCR utilisée).

Conformément aux figures 13 à 16, on décrit ci-après un dispositif à usage unique, c'est-à-dire consommable, ou jetable après emploi, permettant de mettre en oeuvre le procédé d'électro-séparation décrit et exemplifié précédemment.

Un tel dispositif comprend un support 1, ou base, ayant généralement une forme parallélépipédique, comprenant notamment une

face supérieure 1b, une face inférieure 1c et un flanc latéral 1a, montrés sur les Figures 13 et 14.

De manière générale dans ce support 1, sont rassemblés et intégrés, ainsi qu'agencés entre eux, les différents moyens, notamment 5 électrodes requis pour l'électro-séparation, ainsi que des moyens d'interfaçage correspondant au flanc 1a du support 1 avec l'extérieur, d'une part pour le transfert des différents fluides ou liquides vers et/ou hors du support 1, dont l'échantillon biologique traité, le milieu liquide aqueux (tampons) et la fraction enrichie en matière nucléique, et d'autre part pour 10 l'alimentation et la commande des moyens électriques requis au moins pour l'électro-séparation, dont celle du champ électrique.

De manière non représentée, à titre d'exemple, les deux faces 1a et 1b du dispositif, ou carte, sont revêtues d'un film transparent, étanche, adhérant au support, et fermant les différents conduits et cavités 15 représentés en surface aux figures 13 et 14.

Ce dispositif comprend encore :

- un moyen de réception 2 de l'échantillon biologique traité
- un premier réservoir 3 pour un premier milieu liquide aqueux (tampons TBE dilué à 10 fois), comportant lui-même un compartiment 31 20 fermé par une membrane 4 perméable, ayant par exemple une capacité de l'ordre de 100 μ l, ainsi qu'un autre compartiment 32, ayant une capacité de 1 ml, pour la réception d'au moins une fraction obtenue à partir d'un échantillon biologique ; cet autre compartiment est disposé en amont du compartiment 31 selon le sens de circulation du matériel nucléique, sous 25 l'effet du champ électrique, et communique lui-même avec le moyen de réception 2 de l'échantillon biologique

- un second réservoir 5 pour un second milieu liquide aqueux (par exemple tampon TBE, une fois concentré), identique ou différent du premier liquide aqueux, séparé du premier réservoir 3, uniquement par la 30 membrane 4

- deux électrodes 61 et 62 pour générer un champ électrique, communiquant avec deux plots 63 et 64 de contact électrique sur le flanc 1a ; l'une des électrodes, à savoir 61, ou cathode, est au contact du premier milieu liquide aqueux dans le premier réservoir 3, et l'autre 35 électrode 62, ou anode, est au contact du second milieu aqueux dans le second réservoir 5

- un moyen d'extraction 9 de la fraction enrichie en matériel nucléique du compartiment 31 fermé par la membrane 4

Les deux réservoirs 3 et 5 communiquent respectivement avec des événements d'aération 33 et 53, et avec au moins un canal de remplissage 5 34 communiquant en ce qui le concerne avec le second réservoir 5.

Un puits intermédiaire 7 est disposé et communique entre le moyen de réception 2 de l'échantillon biologique et le premier réservoir 3. Ce puits n'est pas obligatoire, puisque le lysat peut être déposé directement dans le compartiment 32. Ce puits 7 est pourvu de moyens 10 permettant de lyser un échantillon cellulaire pour obtenir une fraction soumise ensuite à électro-séparation ; ces moyens sont des électrodes 81 et 82, permettant d'exposer l'échantillon à une ou plusieurs impulsions électriques, conformément au procédé décrit par ailleurs dans la demande de brevet français FR-A-2 763 au nom de la Demanderesse. Ces électrodes 15 81 et 82 communiquent respectivement avec des plots de contact électrique 83 et 84 prévus sur le flanc 1a. Il existe donc deux circuits électriques, l'un associé aux électrodes 81 et 82, et l'autre associé aux électrodes 61 et 62.

I - Préparation du dispositif

20 Avant de démarrer toute réaction, on remplit les réservoirs 3 et 5 de tampon. Ce dernier peut être constitué par un tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) dont la concentration varie d'un réservoir à l'autre. On remplit le premier réservoir 3, supérieur, par le moyen de réception 2, avec du tampon dilué dix fois, et le second réservoir 5, inférieur, par le canal 34 25 avec du tampon une fois concentré. On perce les événements d'aération 33 et 53 au niveau des films étanches recouvrant les faces 1a et 1b, afin de permettre à l'air de s'échapper lors du remplissage des réservoirs.

1) Lyse

30 L'échantillon est introduit dans le moyen de réception 2 à l'aide d'une pipette, manuellement ou par un automate. Le volume de l'échantillon est compris entre 0 et 1 ml. Il arrive alors dans le puits intermédiaire 7 de lyse. La lyse est réalisée grâce à une décharge électrique de 500 V pendant environ 1 seconde, entre les électrodes 81 et 82.

Dans le cas où le volume d'échantillon est supérieur à 50 μ l, 35 plusieurs étapes de lyse sont réalisées les unes après les autres, les

fractions lysées étant transférées au fur et à mesure dans le compartiment 32 de réception.

2) Electro-séparation

Une fois l'échantillon lysé et transféré en totalité dans le 5 compartiment 32 de départ de l'électro-séparation, le premier circuit électrique des électrodes 81 et 82 est ouvert, le deuxième des électrodes 61 et 62 est fermé. Les constituants du lysat chargés négativement vont alors migrer jusqu'à l'anode 62. Les acides nucléiques étant fortement 10 négatifs migreront plus vite. On pourra donc les récupérer sélectivement au-dessus de la membrane 4, au niveau du compartiment de réception 31 par le canal de prélèvement 9.

Le courant imposé pour cette migration est compris entre 0 et 30 mA, sous une tension de 150 V. La durée optimale de migration est d'environ 15 minutes.

15 Afin de récupérer les acides nucléiques, on vide le réservoir 3 supérieur jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de liaison fluidique entre le compartiment 32 et le compartiment de réception 31. On prélève alors avec une pipette, par le canal 9, les 100 µl de tampon contenus dans le compartiment 31. Le prélèvement peut se faire manuellement ou par 20 l'intermédiaire de l'automate.

On peut prévoir de récupérer aussi les protéines purifiées. Pour cela, il faut effectuer deux passes successives d'électro-purification, la première permettant de récupérer la fraction enrichie en acides nucléiques et la deuxième la fraction enrichie en protéines. Dans ce cas précis, les 25 acides nucléiques doivent être récupérés entre les deux passes, et sans vider le réservoir 3 supérieur du tampon qui contient les protéines qui n'ont pas fini de migrer.

Un dispositif tel que précédemment décrit peut ne comprendre que trois électrodes. En effet, les deux cathodes 61 et 81, respectivement 30 affectées au circuit d'électro-séparation et au circuit de lyse, deviennent la cathode commune aux deux circuits. Dans ce cas, la lyse de l'échantillon biologique s'effectue dans le compartiment 32. Un tel dispositif peut être utilisé sur la tranche. Il sera alors facile de l'intégrer dans un automate grâce à ce gain de place.

REVENDICATIONS

1/ Procédé de traitement sous l'action d'un champ électrique en milieu liquide, d'un échantillon biologique comprenant à la fois un matériel nucléique et un matériel non nucléique, par exemple protéique, libres et 5 mobiles dans ledit milieu liquide sous l'action du champ électrique, procédé selon lequel :

- a) on dispose d'une solution tampon,
- b) on dispose d'une membrane perméable, en contact d'un côté avec la solution tampon, et ayant un seuil de coupure prédéterminé pour 10 arrêter le matériel nucléique, du côté de ladite solution tampon, lors de sa migration sous l'action du champ électrique,
- c) on établit ledit champ électrique, en sorte que ses lignes de force passent au sein de la solution tampon, et traversent la membrane perméable,
- 15 d) on dispose l'échantillon biologique dans la solution tampon, en amont de la membrane, selon le sens de circulation du matériel nucléique sous l'action du champ électrique,

caractérisé en ce que :

- on applique le champ électrique directement à l'échantillon 20 biologique dans la solution tampon, pendant une durée limitée et définie, d'une part par le temps suffisant pour l'arrivée sur la membrane et la présence de matériel nucléique du côté de la solution tampon, et d'autre part par le fait qu'au terme de ladite durée le matériel non nucléique n'a pas migré et/ou demeure en cours de migration vers ladite membrane,
- 25 - on prélève le matériel nucléique au terme de ladite durée, moyennant quoi on électro-sépare de l'échantillon biologique au moins le matériel nucléique.

2/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'échantillon biologique comprend un lysat cellulaire.

30 3/ Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'échantillon biologique est disposé sur une autre membrane, du côté de cette dernière en contact avec la solution tampon.

35 4/ Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le temps d'application du champ électrique est au plus de 30 minutes, et préférentiellement compris entre 5 et 30 minutes.

5/ Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la valeur de la molarité de la solution tampon est au moins égale à 0,1 mol/l, et préférentiellement comprise entre 0,1 et 5 mol/l.

6/ Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que 5 le champ électrique a une valeur comprise entre 100 et 250 V, et préférentiellement égale à 150 V.

7/ Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la distance séparant l'échantillon biologique de la membrane perméable, est au moins égale à 30 mm, et préférentiellement à 75 mm.

10 8/ Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'échantillon biologique est obtenu à partir d'un prélèvement d'un liquide corporel, par exemple sang ou crachat respiratoire.

9/ Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'on ajoute une protéinase à l'échantillon biologique.

15 10/ Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la fraction enrichie en matériel nucléique est directement soumise à une étape subséquente d'amplification.

11/ Dispositif à usage unique pour la mise en oeuvre d'un procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé 20 en ce qu'il comprend un support ou base, dans lequel sont rassemblés et intégrés, ainsi qu'agencés entre eux, les différents moyens, notamment électrodes, requis pour l'électroséparation, ainsi que des moyens d'interfaçage (1a, 1b, 1c) dudit support avec l'extérieur, d'une part pour le transfert des différents fluides ou liquides vers et/ou hors du support, dont 25 l'échantillon biologique, la solution tampon, et la fraction enrichie en matériel nucléique, et d'autre part pour l'alimentation et la commande des moyens électriques requis au moins pour l'électroséparation, dont celle du champ électrique.

12/ Dispositif selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il 30 comprend un moyen de réception (2) de l'échantillon biologique ; un réservoir (3) pour la solution tampon, comportant un compartiment (31) fermé par la membrane (4) perméable, communiquant à une extrémité opposée audit compartiment (31) avec le moyen de réception (2) de l'échantillon biologique, ledit réservoir étant destiné à recevoir une première 35 solution tampon ; et un second réservoir (5) pour une seconde solution tampon, identique ou différente de la première solution tampon, séparé du

premier réservoir uniquement par ladite membrane; deux électrodes (61, 62) de génération du champ électrique, l'une (61) au contact de la première solution tampon, en amont de la membrane selon le sens de circulation du matériel nucléique, et l'autre (62) au contact de la seconde solution 5 tampon; et un moyen d'extraction (9) de la fraction enrichie en matériel nucléique du compartiment fermé (31) par la membrane.

13/ Dispositif selon la revendication 12, caractérisé en ce que le réservoir (3) comprend un autre compartiment (32), pour la réception d'au moins une fraction obtenue à partir de l'échantillon biologique, disposé en 10 amont dudit compartiment (31) selon le sens de circulation du matériel nucléique, communiquant avec le moyen de réception de l'échantillon biologique.

14/ Dispositif selon la revendication 12, caractérisé en ce que les deux réservoirs (3,5) communiquent respectivement avec des événements 15 d'aération (33,53), et avec au moins un canal de remplissage (34).

15/ Dispositif selon la revendication 12, caractérisé en ce que un puits intermédiaire (7) est disposé et communique entre le moyen de réception (2) de l'échantillon biologique et le premier réservoir (3).

16/ Dispositif selon la revendication 15, caractérisé en ce que le 20 puits intermédiaire (7) est pourvu de moyens permettant de lyser un échantillon cellulaire.

17/ Dispositif selon la revendication 16, caractérisé en ce que le puits intermédiaire (7) est pourvu d'électrodes (81,82) assurant une lyse dudit échantillon cellulaire.

25 18/ Dispositif selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il comprend, communiquant les uns avec les autres, un compartiment (32) de réception du lysat, un puits intermédiaire de lyse (7), et un compartiment de réception (31) de la fraction enrichie en matériel nucléique.

19/ Dispositif selon la revendication 18, caractérisé en ce que le 30 volume du compartiment de réception (32) du lysat est supérieur au volume du compartiment de réception (31) de la fraction enrichie en matériel nucléique.

20/ Dispositif selon la revendication 19, caractérisé en ce que la proportion entre les volumes des compartiments de réception du lysat et de 35 réception de la fraction nucléique est comprise entre $\frac{1}{2}$ et $\frac{1}{50}$, notamment entre 1/5 et 1/20.

21/ Utilisation du dispositif selon les revendications 11 à 20, pour électro-séparer une fraction ou la totalité des acides nucléiques à partir d'un lysat cellulaire.

22/ Utilisation de la fraction électro-séparée par la mise en oeuvre du procédé selon les revendication 1 à 10 pour détecter et/ou identifier des acides nucléiques directement après amplification.

1/8

FIG 1

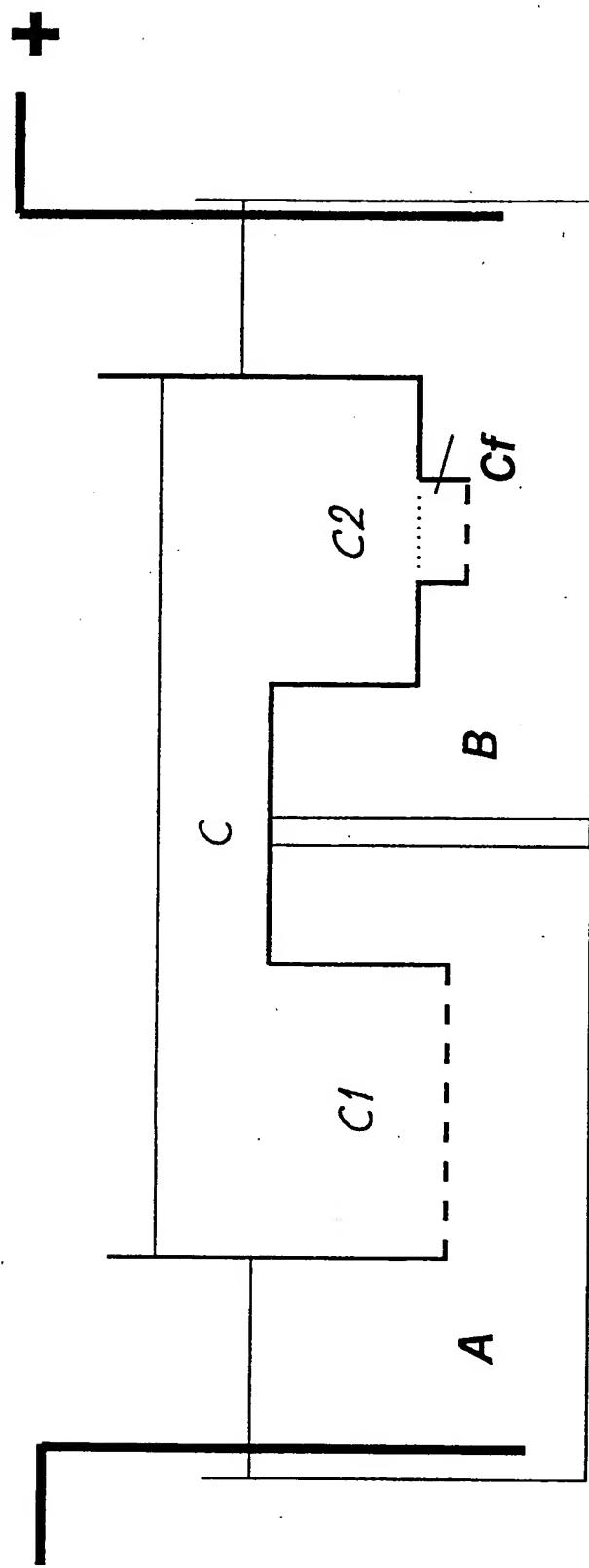


FIG 2

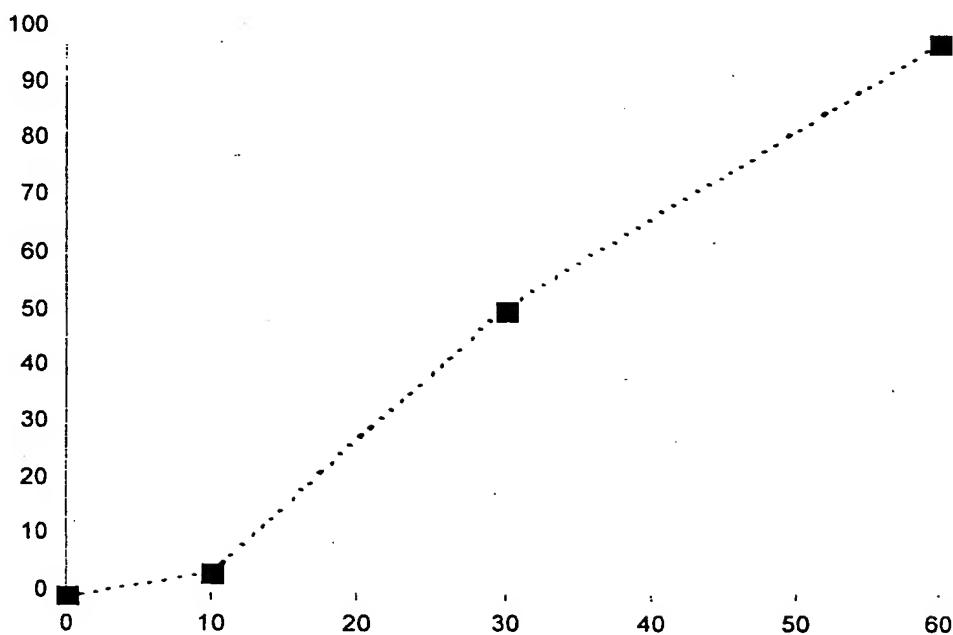


FIG 3

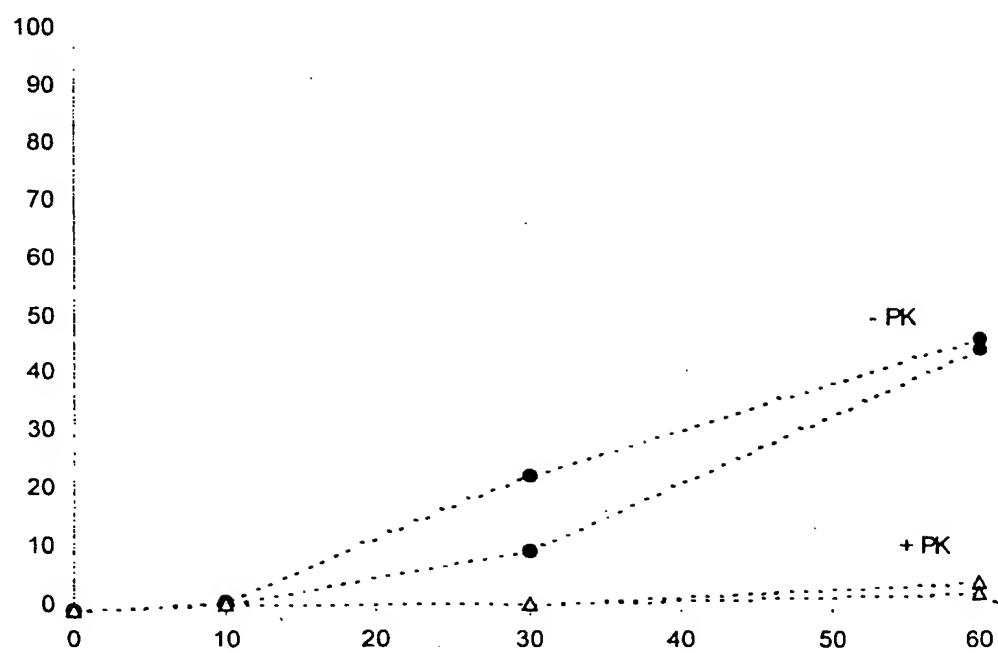


FIG4

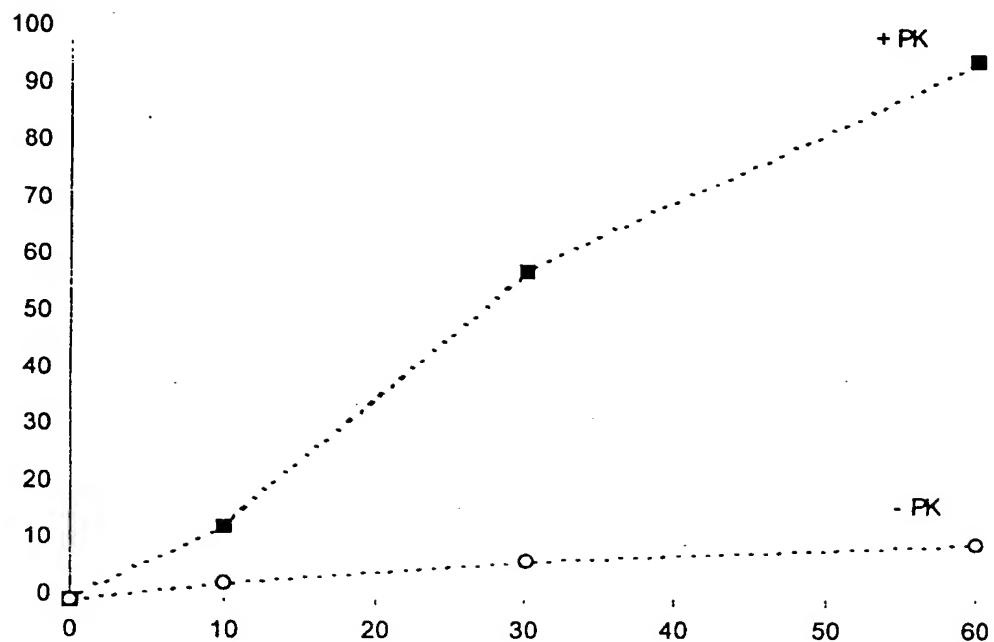


FIG5

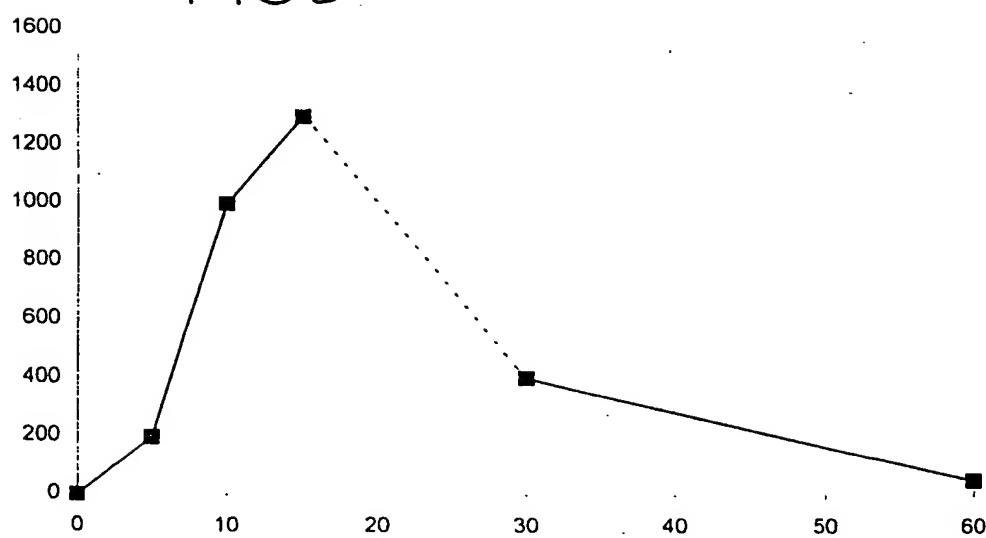


FIG 6

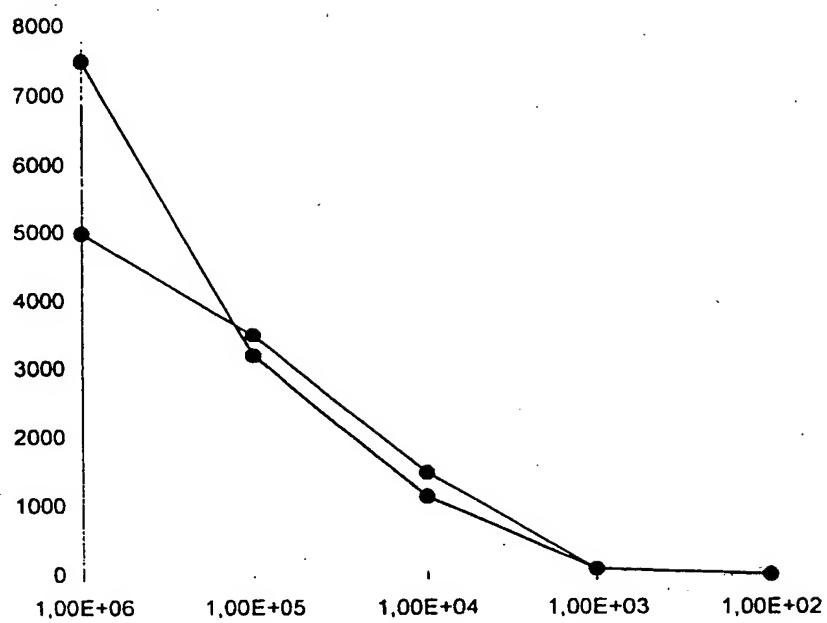


FIG 7

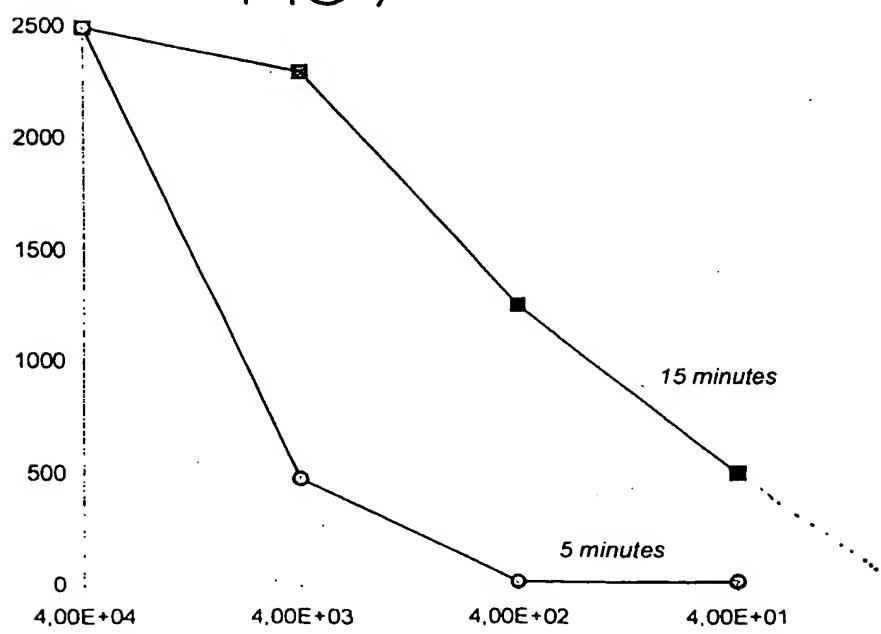


FIG 8

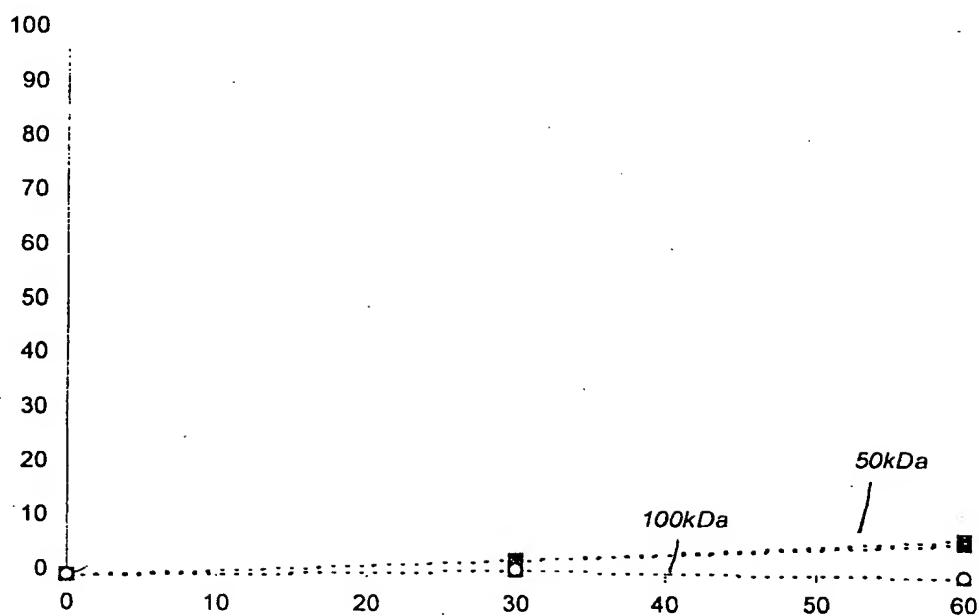


FIG 9

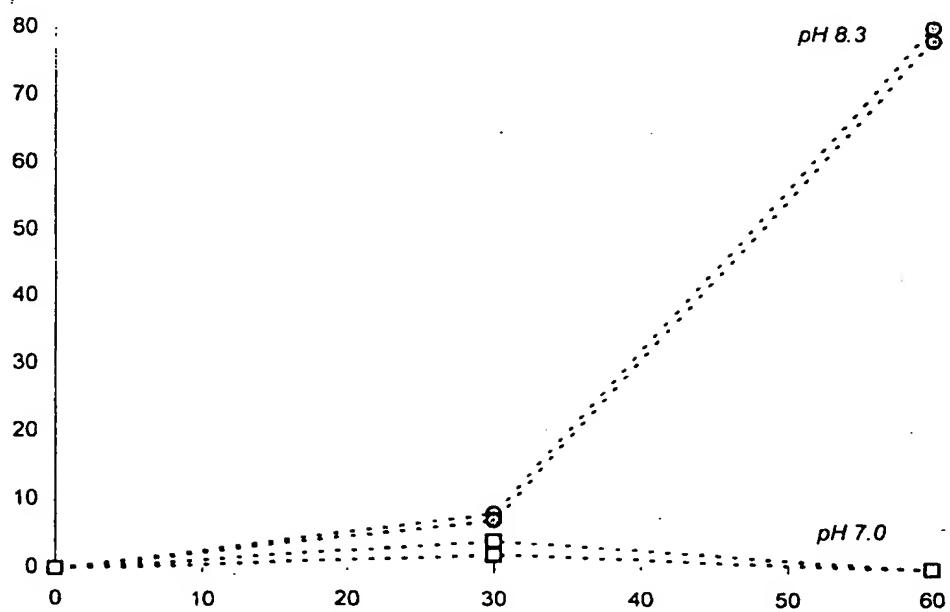


FIG 10

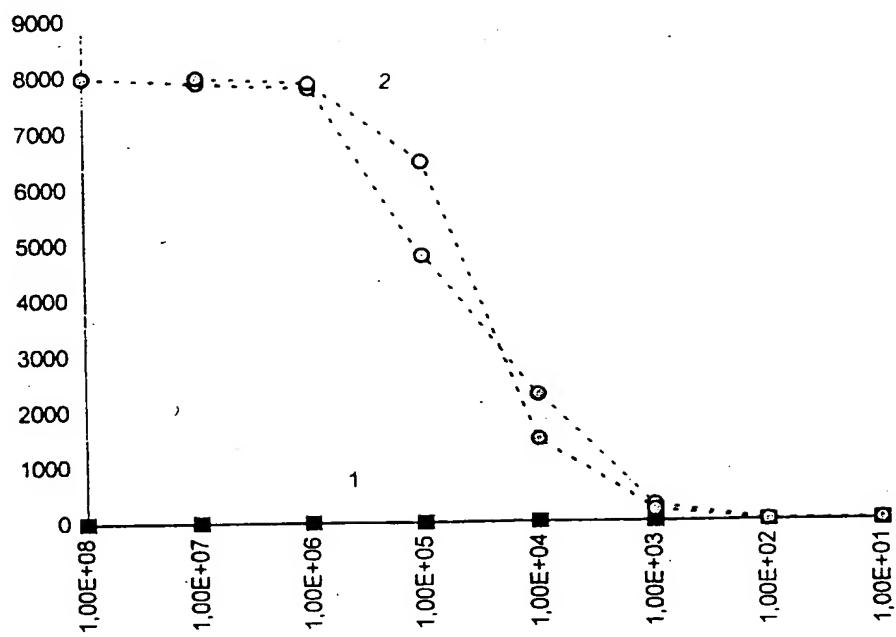


FIG 11

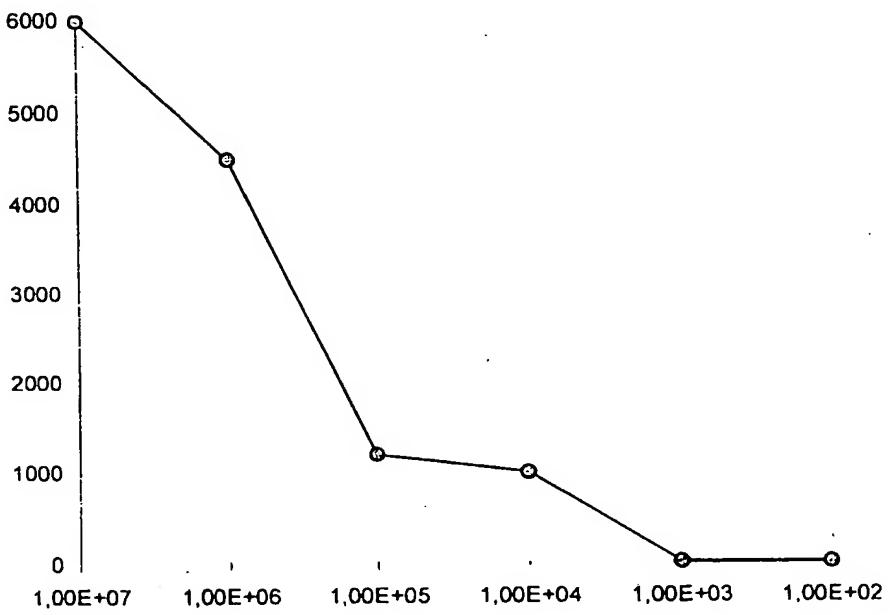


FIG 12

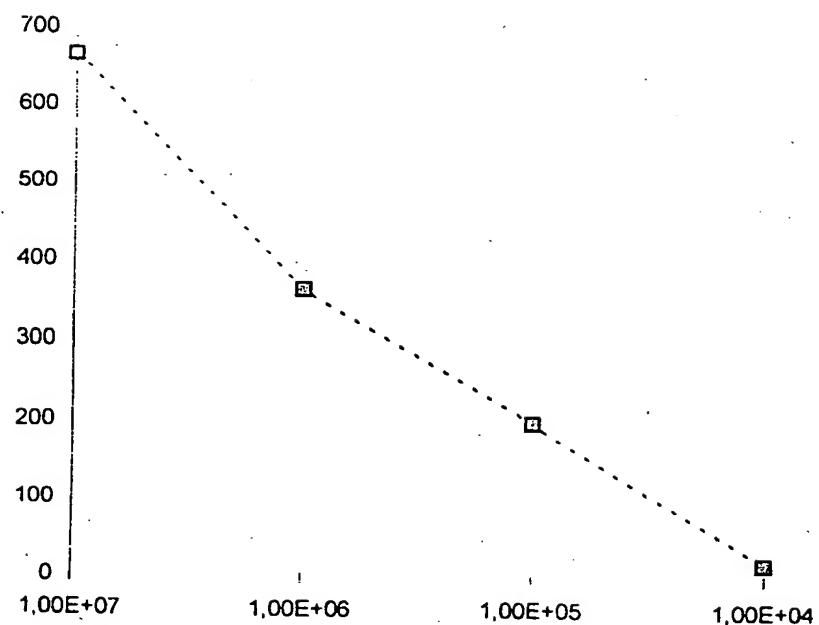


FIG 13

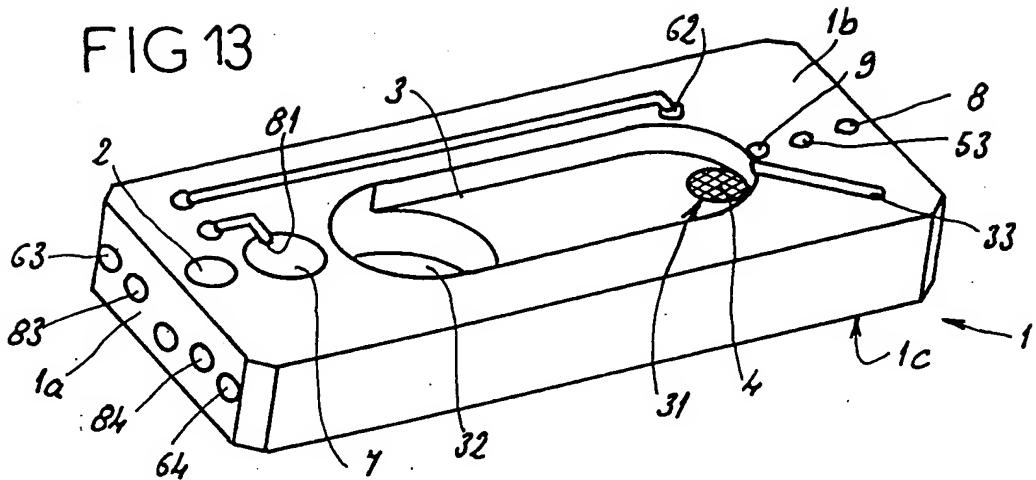


FIG14

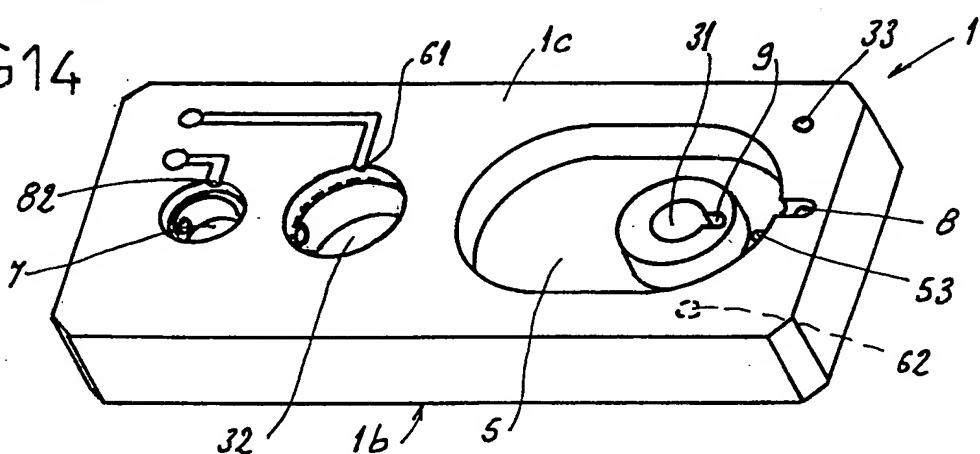


FIG 15

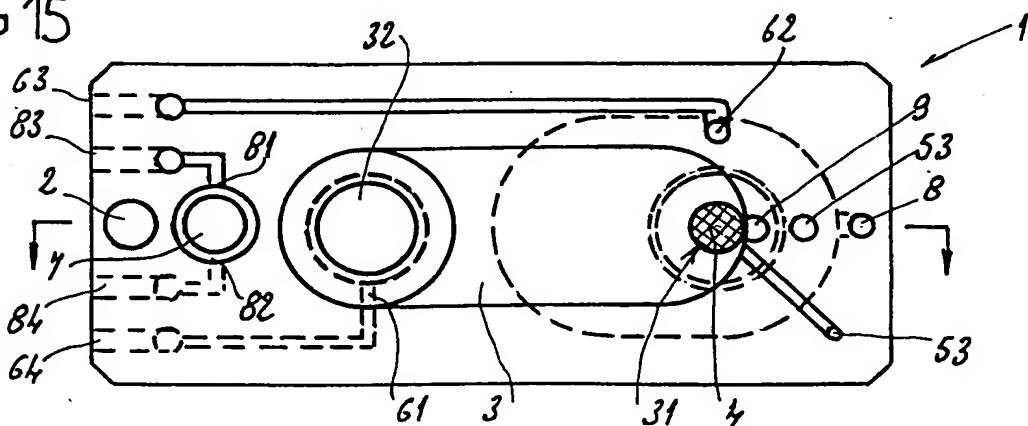
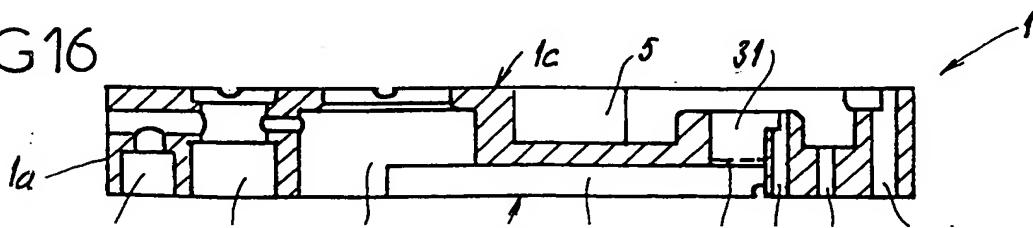


FIG 16



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No

PCT/FR 99/00830

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N27/447 G01N1/34 //C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97 34908 A (LANGE HANS; INNOVA GES ZUR ENTWICKLUNG UND (DE)) 25 September 1997 cited in the application see page 6, line 1 - page 7, line 10 see page 11, line 26 - page 12, line 12; figures; examples 2,3,6 ---	1-14,21, 22
A	US 4 164 464 A (MCCULLOUGH GAIL A ET AL) 14 August 1979 cited in the application see column 7, line 28 - column 8, line 3; figures 4-6,14 ---	1,3,11, 12,14 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the International search report

29 June 1999

06/07/1999

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2

Authorized officer

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 99/00830

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 415 758 A (COMEAU ANNE M) 16 May 1995 cited in the application see column 7, line 41 - line 55 see column 9, line 26 - column 10, line 68; figure 5 ----	1,3-6,8, 10-12, 21,22
A	US 4 750 982 A (TOMBLIN GRAHAM J ET AL) 14 June 1988 see column 5, line 27 - column 6, line 8; figures 3,4 ----	1,2,8,9, 11,21,22
A	WO 97 41219 A (SCIENT GENERICS LTD; WATSON SUSAN (GB); MARTIN SOPHIE E) 6 November 1997 cited in the application see page 1 - page 2 -----	1,2,4, 10-19, 21,22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 99/00830

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 9734908	A	25-09-1997		DE 19610354 C EP 0891369 A		20-11-1997 20-01-1999
US 4164464	A	14-08-1979		US 4159933 A CA 1078330 A DE 2808344 A GB 1556963 A		03-07-1979 27-05-1980 12-10-1978 05-12-1979
US 5415758	A	16-05-1995		NONE		
US 4750982	A	14-06-1988		US 4617102 A EP 0196790 A		14-10-1986 08-10-1986
WO 9741219	A	06-11-1997		EP 0904364 A		31-03-1999

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den. Internationale No
PCT/FR 99/00830

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 G01N27/447 G01N1/34 //C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porte la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 97 34908 A (LANGE HANS; INNOVA GES ZUR ENTWICKLUNG UND (DE)) 25 septembre 1997 cité dans la demande voir page 6, ligne 1 - page 7, ligne 10 voir page 11, ligne 26 - page 12, ligne 12; figures; exemples 2,3,6 ---	1-14,21, 22
A	US 4 164 464 A (MCCULLOUGH GAIL A ET AL) 14 août 1979 cité dans la demande voir colonne 7, ligne 28 - colonne 8, ligne 3; figures 4-6,14 ---	1,3,11, 12,14 -/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

29 juin 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

06/07/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2

Fonctionnaire autorisé

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den Internationale No
PCT/FR 99/00830

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 5 415 758 A (COMEAU ANNE M) 16 mai 1995 cité dans la demande voir colonne 7, ligne 41 - ligne 55 voir colonne 9, ligne 26 - colonne 10, ligne 68; figure 5 ----	1,3-6,8, 10-12, 21,22
A	US 4 750 982 A (TOMBLIN GRAHAM J ET AL) 14 juin 1988 voir colonne 5, ligne 27 - colonne 6, ligne 8; figures 3,4 ----	1,2,8,9, 11,21,22
A	WO 97 41219 A (SCIENT GENERICS LTD; WATSON SUSAN (GB); MARTIN SOPHIE E) 6 novembre 1997 cité dans la demande voir page 1 - page 2 -----	1,2,4, 10-19, 21,22

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Document brevet cité
au rapport de recherche

Date de publication

Membre(s) de la
famille de brevet(s)

Date de publication

PCT/FR 99/00830

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9734908 A	25-09-1997	DE 19610354 C EP 0891369 A	20-11-1997 20-01-1999
US 4164464 A	14-08-1979	US 4159933 A CA 1078330 A DE 2808344 A GB 1556963 A	03-07-1979 27-05-1980 12-10-1978 05-12-1979
US 5415758 A	16-05-1995	AUCUN	
US 4750982 A	14-06-1988	US 4617102 A EP 0196790 A	14-10-1986 08-10-1986
WO 9741219 A	06-11-1997	EP 0904364 A	31-03-1999

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.